Vergleich zweier Methoden zur Trennung von Lipoproteinen in der präparativen Ultrazentrifuge

Wolfgang Löffler

1981

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. N. Zöllner

Vergleich zweier Methoden zur Trennung von Lipoproteinen in der präparativen Ultrazentrifuge

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Wolfgang Löffler
aus
Hindelang
1981

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Günther Wolfram
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Nepomuk Zöllner
Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 2o.Oktober 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen Kindern

Bernadette
Bertram
Beatrix

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546818_0063

Inhaltsverzeichnis

1.0 Einleitung
1.1 Einfluß der Lipoproteine auf die Entstehung von Arteriosklerose
1.2 Methoden der Lipoproteinanalyse
1.3 Abnorme Lipoproteine
2.0 Material und Methoden
2.1 Versuchspersonen
2.2. Nahrung
2.3 Versuchsanordnung
2.31 Stufenweise Ultrazentrifugation mit dem Festwinkel-Rotor
2.32 Ultrazentrifugation von diskontinuierlichen Gradienten mit dem Ausschwing-Rotor
2.33 Quantitative Proteinbestimmung nach LOWRY
2.34 Quantitative Bestimmung der ß-Lipoproteine mittels M-Partigen ß-Lipoprotein-Immundiffusionsplatten
2.35 Quantitative Bestimmung der Albumine mittels M-Partigen Albumin-Immundiffusionsplatten
3.0 Ergebnisse
3.1 Vergleich der Proteinkonzentrationen, ermittelt durch Präparation mittels Festwinkel- und Ausschwing-Rotor
3.2 Vergleich der Reproduzierbarkeit der Proteinkonzentrationen, ermittelt durch Präparation mittels Festwinkel- und Ausschwing-Rotor
3.3 Bestimmung von Apolipoprotein B und Albumin mittels M-Partigen Immundiffusionsplatten als Parameter für die Reinheit der Präparation beim Festwinkel- und Ausschwing-Rotor
3.4 Beeinflußbarkeit der Lipoproteinkonzentrationen durch die Formeldiäten II, V und VII
4.0 Diskussion
5.0 Zusammenfassung
6.0 Anhang
7.0 Literatur

1.0 Einleitung

1.1 Einfluß der Lipoproteine auf die Entstehung von Arteriosklerose

Die Werte der Lipoidkonzentrationen sind nach FREDRICKSON (1978) im statistischen Sinne oftmals als durchaus normal zu bezeichnen, während sie klinisch als pathologisch angesehen werden müssen. Absolute Werte spiegeln oft nicht die Schwere einer Stoffwechselerkrankung wieder. Der Einfluß der Ernährung auf die Serumlipide ist wissenschaftlich eindeutig belegt (SCHLIERF und WOLFRAM, 1977; FREDRICKSON, 1978). Nach MOORE (1967) und SCHILLING (1969) steigt speziell der Serumcholesterinspiegel mit dem Alter an und korreliert nach RIFKIND (1969) mit einem Abfall der das Cholesterin transportierenden HDL- Fraktion. Nach einer Untersuchung von MILLER (1975) besteht ein Zusammenhang zwischen Arteriosklerose und einem niedrigen HDL- Spiegel. Eine geringe HDL - Fraktion bedingt einen schlechten Abtransport von Cholesterin aus der Arterienwand und leistet so einer entstehenden Arteriosklerose Vorschub. Nach CASTELLI (1977) korreliert ein niedriger HDL - Spiegel mit dem Herzinfarktrisiko. Allerdings kann man aus dem Grad der Verminderung der HDL-Fraktion nicht auf den Schweregrad der zu erwartenden Erkrankung schließen (BRADBY, 1978).

Hohe LDL – Werte und niedrige HDL - Werte fanden STREJA et al. (1978) bei der familiären Hypercholesterinämie. Diese Erkrankung geht mit einem bei Männern um das drei- bis fünffach erhöhten Herzinfarktrisiko einher. Hohe LDL-Werte sind nach JENKINS (1978) ein schlechterer Risikoindikator für den Herzinfarkt als niedrige HDL - Serumspiegel.

Das Herzinfarktrisiko kann durch Erhöhung der HDL - Serum - fraktion vermindert werden. Wichtig ist dabei zuerst die Behandlung einer eventuell vorhandenen Adipositas. Auch durch Alkohol wird nach EWING (1977) und CASTELLI (1977) der HDL- Serumspiegel gehoben, was aber wegen der Risiken für die Leber problematisch ist.

Auch körperliche Betätigung wie der Dauerlauf senkt das Herzinfarktrisiko insofern, daß nach WOOD (1979) die Steigerung des HDL - Serumspiegels der Anzahl der gelaufenen Kilometer proportional ist.

Ein wesentlicher Risikofaktor für das Infarktgeschehen ist das Rauchen. SAMPSON et al. (1978) wiesen nach, daß Raucher niedrigere HDL- Serumspiegel haben als Nichtraucher, aber bei Aufgabe des Zigarettenkonsums sich nach einem Jahr wieder normale Serumwerte finden lassen.

Eine Zufuhr von polyenreichen Fettsäuren mit der Nahrung kann das LDL- Cholesterin senken, ohne den HDL- Serumspiegel zu verändern (HULLEY et al., 1979). Schon GROEN (1952) und KINSELL (1952) beobachteten, daß man mit dieser leicht durchführbaren diätetischen Maßnahme den Cholesterinspiegel im Serum senken kann. Der Cholesterinspiegel kann um 20-40% gesenkt werden, wenn die gesättigten durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren ersetzt werden (AHRENS, 1975). Eine Häufung maligner Neubildungen dabei hat sich statistisch nicht bestätigt (EDERER, 1971; MEITTINEN, 1972).

1.2 Methoden der Lipoproteinanalysen

Man kann durch die Elektrophorese vier verschiedene Lipoproteine unterscheiden, die Chylomikronen, die prä- ß-Lipoproteine, die ß- Lipoproteine und die α -Lipoproteine. Sie transportieren Cholesterin, Triglyceride und Phospholipide.

Durch den Zusatz von Agarose und Agarosegel zum Trennmedium kann man die Trennschärfe erheblich verbessern (RAPP und NOBLE, 1968). Heute handelt es sich üblicherweise um eine Ionenelektrophorese, bei der feste Medien zur Auftrennung der Lipoproteine verwendet werden. Die elektrische Ladung der Lipoproteine, die negativ geladene Anionen sind, wird vom Apolipoprotein bestimmt. Die aufgetragenen Lipoproteine wandern von der Kathode zur Anode, wobei Dichte, d.h. Konzentration und Reinheit der verwendeten Trenn-

medien, eine Rolle für die Ergebnisse spielen. Bei der Cellulose - Acetat- Elektrophorese (CHARMAN, 1967; CHIN, 1968) ist der technische Aufwand erheblich geringer als bei der Gel - Elektrophorese. Nach SEIDEL (1972) kann man die elektrophoretisch aufgetrennten Lipoproteine nach Präzipitation mit Polyanionen quantitativ nachweisen. Besonderes Interesse gilt der Anfärbbarkeit der Lipoproteine. Als Fett - Farbstoff dient Sudanschwarz und Ölrot. Die LDL- Fraktionen können mit Heparin-Mangan ausgefällt werden (BURNSTEIN, 1970). Nach SEIDEL et al. (1973) werden Lipoproteine durch Ausfällen mit Heparin- $MgCl_2$- NaCl und Dextransulfat 2000- $CaCl_2$ dargestellt. Bereits 1965 wiesen FREDRICKSON und LEES nach, daß die Lipoproteinfraktionen, die man mittels Ultrazentraifugation erhält, ziemlich genau der Lokalisation der Lipoproteine in der Elektrophorese entsprechen.

Zur Verwendung sollte nur Nüchternserum kommen. Enthält das zu untersuchende Serum Chylomikronen, so sind der Anwendung der Elektrophorese Grenzen gesetzt. BLANKENHORN (1968) wie auch CHARMAN (1973) wiesen nach, daß diese Lipoproteine nicht nur an der Auftragsstelle liegenbleiben, sondern zu einem gewissen Prozentsatz in der Prä - ß- Bande nachzuweisen sind. Da sich in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme das Lipoproteinmuster ändern kann, sollten diese Untersuchungen nur in nüchternem Zustand vorgenommen werden (VOGELBERG, 1973).

Die Immunelektrophorese (GRABAR und WILLIAMS, 1955) und weiterentwickelt von HOLLMANN und PAPENBERG (1970) ermöglicht die Differenzierung einzelner Fraktionen der Serumlipoproteine. Das Prinzip beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung des Serums in einem 1-1,2%igen Gel und anschließender immunologischer Präzipitation durch Antikörper, die mit dem Protein- und Kohlenhydratanteil der Blutfette Reaktionen eingehen. Die Antikörper, gewonnen von Pferd und Kaninchen, diffundieren senkrecht zur Ionenwanderungsrichtung in das Gel- Lipoprotein- Medium. Nach Stunden können Antigen- Antikörper- Komplexe nachgewiesen werden, die sich als zarte Bänder darstellen. Jedes Protein bildet einen eigenen Niederschlag.

OUCHTERLONY (1958) wies nach, daß eine Präzipitation von Lipoproteinen ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung möglich ist. Diese Geldiffusionsmethode beruht auf der Präzipitation von Lipoproteinen durch spezifische Antiseren, einer Ausbildung von Präzipitationsbanden auf einer Agargelplatte. Das Antiserum wird in ein zentral ausgestanztes Loch pipettiert, in periphere Löcher die verschiedenen Lipoproteine (WALTON, 1973).

Die Technik der Ultrazentrifugation, von SVEDBERG entwickelt, bei der in den modernen Ultrazentrifugen 40 ooo bis 60 ooo Umdrehungen pro Minute bei etwa 3oo ooofacher Erdbeschleunigung erreicht werden, beruht darauf, die Lipoproteinfraktionen unterschiedlicher Dichte in Salzlösungen mit verschiedenen Konzentrationen durch stufenweise Ultrazentrifugation zu trennen. Außerdem wird heute für analytische Untersuchungen die Dichte- Gradienten- Ultrazentrifugation verwendet (ANDERSON, 1965; GRIFFITH, 1976). Als Lösungen finden Saccharose, NaCl-, NaBr- und KBr Verwendung. HAVEL stellte Lösungen geringerer Dichte durch Verdünnen mit o,15mol NaCl- Lösung her (1965).

In der obersten Dichtezone finden sich, sofern man nicht Nüchternserum verwendet, die Chylomikronen. Diese Fraktion mit der geringsten Dichte enthält die meisten Lipide, wobei der Proteinanteil bei 1% liegt und aus den Apolipoproteinen B und C besteht. Die dem Transport von endogen gebildeten Triglyceriden dienende VLDL- Fraktion kann aus der nächsten Dichtezone isoliert werden. Sie wird nach WINDMUELLER und LEVY (1967) hauptsächlich in der Leber gebildet. GUSTAVSON et al. (1966) wiesen nach, daß die VLDL-Fraktion außer dem Apolipoprotein A und B auch das Apo C enthält, dessen hohe Phospholipid- Bindungskapazität wahrscheinlich die Stabilität der proteinarmen VLDL- Partikel sichert. WINDMUELLER und LEVY (1968) fanden, daß für die Bildung des Apolipoproteins C die Zellen des Intestinums verantwortlich sind. 1968 zeigten MAHLEY et al. und STEIN et al., daß als Syntheseort der Golgiapparat der Leber in Frage kommt. Die VLDL-

Fraktion findet sich in zeitlicher und quantitativer Abhängigkeit zur Fettaufnahme. Zwischen den Chylomikronen und den sehr leichten Lipoproteinen der VLDL kann man keine scharfe Trennlinie ziehen. In diesem Übergangsfeld findet man Sekundärpartikel, sog. Intermediärprodukte, die nach BIERMANN (1970) aus denChylomikronen hervorgehen, sich aber in Größe und Proteinanteil von Ihnen unterscheiden.

Die 25% Protein enthaltende LDL- Fraktion findet sich in der nächsten Dichtezone. Sie wandert elektrophoretisch mit der ß- Globulin- Fraktion und wird deshalb ß-Lipoprotein genannt. Mit der Ultrazentrifuge konnten NORUM et al. (1971) die LDL in zwei Dichte-Gruppen trennen, wobei diejenige mit der Dichte 1,o18 - 1,063 g/ml wahrscheinlich beim Abbau von VLDL- Partikeln entsteht. Die LDL- Fraktion enthält vor allem Apo B. Nach LEVY und FREDRICKSON (1965) gibt es zwischen VLDL- und LDL- Fraktion ein "intermediäres" Lipoprotein.

Die HDL- Fraktion zeigt α -Motilität. Sie wird zusammen mit Apo A ausschließlich in den Leberzellen synthetisiert. Jede Leberfunktionsstörung macht sich in einem Absinken dieser Serumlipidfraktion bemerkbar (BUNGENBERG et al., 1968).

1.3 Abnorme Lipoproteine

Mittels Elektrophorese und Ultrazentrifugation lassen sich aber auch vom Normalen abweichende Lipoproteine nachweisen, die bei bestimmten Erkrankungen gehäuft vorkommen. eine abnorme HDL- Fraktion beobachtete UTERMANN (1971) bei angeborenem Mangel an Lecithin- Cholesterin- Acryl-Transferase. Bei der Hyperthyreose wird im Serum ein Lipoprotein gefunden, das in der Elektrophorese zwar ß- Motilität zeigt, aufgrund seiner Dichte aber zur HDL- Fraktion gerechnet werden muß. WIELAND et al. (1972) bezeichnete es deshalb auch als ß- HDL. In der LDL- Fraktion kommt eine genetisch determinierte Variante, das Lp (a), vor (BERG, 1963). VOGELBERG et al. (1973) sahen einen Zusammenhang zwischen Fettstoffwechselstörung und Lp (a). Nach BERG besteht ein Zusammen-

hang mit Atherosklerose und koronarer Herzkrankheit. Von SEIDEL und GRETEN (197o) wurde ein "flotierendes" ß- VLDL beschrieben, welches beim Typ III der Hyperlipidämien nach FREDRICKSON vorkommt. QUARFORDT et al. (1971) nahmen an, daß es sich hierbei um eine Abbaustörung der VLDL- Fraktion handelt. Das LP- X, dessen immunologische Identifizierung ALAUPOVIC (1969) und SEIDEL (197o) gelang, kommt bei Verschlußikterus mit Cholestase vor. Bei dieser Erkrankung ist die LDL- Fraktion vermehrt und der größte Teil dieser Lipoproteine in Form des LP- X abgewandelt.

Die stufenweise Ultrazentrifugation im Festwinkel- Rotor erfordert einen großen zeitlichen Aufwand. Die wünschenswerte Verkürzung der Präparationszeit auf etwa die Hälfte gelingt bei der Präparation mit diskontinuierlichem Gradienten im Ausschwing- Rotor. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, diese beiden Methoden miteinander zu vergleichen. Lipoproteinkonzentrationen, gemessen nach der Methode LOWRY sowie mittels M- Partigen Albumin- und M- Partigen ß-Lipoprotein- Immundiffusionsplatten, waren dabei die Vergleichsparameter.

2.0 Material und Methoden

2.1 Versuchspersonen

Freiwillige Versuchspersonen waren fünf Studenten und eine Studentin im Alter von 23 bis 26 Jahren. Körpergewicht, Größe und tägliche Energieaufnahme bei gleichbleibendem Körpergewicht sind der Tab. 1 zu entnehmen.

2.2. Nahrung

Jeder Versuchsperson wurde täglich eine Formeldiät, deren Energiegehalt 3000 kcal entsprach, gegeben, von der die nicht aufgegessene Menge am nächsten Tag zurückgewogen wurde. Zur geschmacklichen Veränderung wurde Zimt und/oder Glucose, deren Energiegehalt berücksichtigt wurde, verwendet. Leitungswasser und andere kalorienfreie Getränke konnten unbeschränkt zugeführt werden. Der Eiweiß- Kohlehydrat- und Fettanteil aller Formeldiäten waren gleich; die Zusammensetzung des Fettanteils der drei Formeldiäten II, V und VII waren dagegen durch unterschiedlich hohen Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren verschieden (Tab. 2). Bei Normalkost konnten die Versuchspersonen über Menge und Zusammensetzung ihrer Nahrung selbst entscheiden.

2.3 Versuchsanordnung

Jeweils zwei der Versuchspersonen erhielten während je zwei Wochen (eine Formeldiätperiode) die gleiche der drei verschiedenen Formeldiäten. Nach zwei Wochen wurden die Formeldiäten gemäß Tab. 3 gewechselt. Drei Tage vor Ende einer Formeldiätperiode und am letzten Tag einer Formeldiätperiode morgens wurde Nüchternblut abgenommen und die Lipoproteinkonzentrationen bestimmt. Vier Wochen nach Abschluß der Formeldiätzufuhr wurden die Lipoproteinkonzentrationen unter Normalkost gemessen.

2.31 Stufenweise Ultrazentrifugation mit dem Festwinkel- Rotor.

In der Beckman-Ultrazentrifuge des Typs L 5-50 diente der Festwinkel- Rotor Typ 50 TI, Beckman Instruments, INC., Palo Alto, California, im nachfolgenden FW- Rotor genannt, als Rotor.

Das mit EDTA versetzte Nüchternblut wurde sofort nach Blutentnahme 15 Minuten bei 3000 U/min. zentrifugiert. 8 ml Serum wurden in je ein Zentrifugengefäß (Beckman Cellulose Nitrate Tube No. 331370, Size 9/16 "dia 3 1/2), im nachfolgenden CN-Tube benannt, pipettiert. Das fehlende Volumen, im das CN- Tube zu füllen, wurde mittels o,15 mol NaCl-Lösung mit der Dichte D = 1,005 g/ml ergänzt. Die CN-Tubes wurden daraufhin luftfrei mit Aluminium-Kappen verschlossen. Der FW-Rotor wurde mit den CN-Tubes beschickt, wobei nicht auf geringe Erschütterung, bzw. Beschleunigung, geachtet werden mußte. Nach 2o-stündiger Laufzeit bei 41000 U/min und 4°C wurde der FW-Rotor langsam abgebremst. Die CN-Tubes wurden mit der Beckman-Schneidevorrichtung so geschnitten, daß das Messer etwa 4 ml Überstand abtrennte. Dieser wurde mit einer Injektionsnadel abgesaugt und die Volumina der erhaltenen VLDL- und ersten Restfraktion gemessen.

6 ml der ersten Restfraktion wurden mit einer KBr-NaCl-Lösung auf eine Dichte D = 1,o63 g/ml eingestellt. Da ein blasenfreies CN-Tube mit aufgesetzter Aluminium-Kappe 11,8 ml enthält, mußten noch 5,8 ml der KBr-NaCl- Lösung zugemischt werden. Die Dichte dieser Lösung errechnete sich wie folgt:

$$6 \times 1{,}006 + 5{,}8 \times D = (6 + 5{,}8) \times 1{,}063$$
$$5{,}8 \times D = 11{,}8 \times 1{,}063 - 6 \times 1{,}006$$
$$5{,}8 \times D = 6{,}5074$$
$$D = 1{,}12196$$
$$\approx 1{,}122$$

Diese KBr- NaCL-Lösung der Dichte D = 1,122 g/ml wurde aus 0,15 mol NaCl- Lösung (A) der Dichte D = 1,005 g/ml und einer KBr- Lösung (B) der Dichte D = 1,346 g/ml gemischt:

$$A \times 1{,}005 + B \times 1{,}346 = (A + B) \times 1{,}122$$
$$= A \times 1{,}122 + B \times 1{,}122$$
$$\frac{B}{A} = \frac{1{,}346 - 1{,}122}{1{,}122 - 1{,}005}$$
$$= \frac{0{,}224}{0{,}117}$$
$$B/A = 1{,}9145$$

D.h., 100 ml Lösung (B) wurde mit 191,5 ml Lösung (A) gemischt. Durch 2o-stündiges Ultrazentrifugieren bei 41000 U/min erhielt man die LDL-Fraktion und die zweite Restfraktion.

5 ml der zweiten Restfraktion wurden durch Zumischen einer Salzlösung der Dichte D = 1,334 g/ml auf eine Dichte D = 1,225 g/ml entsprechend obigem Rechengang gebracht. Die HDL- Fraktion war nach 40-stündigem Ultrazentrifugieren bei 41000 U/min isoliert.

Die Dichte der Salzlösungen wie auch der Salz-Serummischungen wurden mit zwei Methoden überprüft:
1. Eine definierte Menge der auf ihre Dichte zu untersuchende Flüssigkeit wurde in ein Reagenzglas pipettiert und abzüglich das Glasgewicht gewogen (Mettlerwaage H 54 AR).
2. Volumenmessung mit einem Pyknometergefäß, wobei das Volumen mit dem Flüssigkeitsgewicht in Relation gesetzt wurde.

Die Lipoprotein-Serumkonzentrationen wurden aufgrund der Extinktionen E bei der quantitativen Proteinbestimmung nach LOWRY (siehe 2.33) wie folgt berechnet:

$$SeK_{VLDL} = E \times \frac{10}{\varepsilon_o} \times \frac{VLDL - FrVol}{SeVol} \quad (mg\%)$$

$$SeK_{LDL} = E \times \frac{10}{\varepsilon_o} \times \frac{LDL - FrVol}{SeVol} \times \frac{1.UVol}{wVol\ (1)} \quad (mg\%)$$

$$SeK_{HDL} = E \times \frac{10}{\varepsilon_o} \times \frac{HDL - FrVol}{SeVol} \times \frac{1.UVol}{wVol(1)} \times \frac{2.Uvol}{wVol(2)} \quad (mg\%)$$

SeK = Serumkonzentration einer Lipoproteinfraktion
E = gemessene Extinktion
ε_o = Extinktionskoeffizient
FrVol = gemessene Volumen des jeweiligen Überstandes einer Lipoproteinfraktion nach einem Ultrazentrifugationsdurchgang (UZD)
SeVol = Volumen des eingesetzten Serums beim 1. UZD (8ml)
1.UVol = Volumen der ersten Restfraktion nach dem 1. UZD
wVol(1) = Volumen der weiterverwendeten Serum- Salz- Lösung für den 2. UZD (6ml)
2.UVol = Volumen der 2.Restfraktion nach dem 2. UZD
wVol(2) = Volumen der weiterverwendeten Serum-Salz- Lösung für den 3. UZD (5ml)

Die Apoliprotein B- Serumkonzentrationen wurden aufgrund von Durchmessern der Präzipitationshöfe mit M-Partigen ß- Lipoprotein- Immundiffusionsplatten (siehe 2.34) wie folgt berechnet:

$$SeK_{VLDL} = (2{,}3 \times d^2 - 27{,}6) \times \frac{VLDL - FrVol}{SeVol} \quad (mg\%)$$

$$SeK_{LDL} = (2{,}3 \times d^2 - 27{,}6) \times \frac{LDL - FrVol}{SeVol} \times \frac{1.UVol}{wVol(1)} \quad (mg\%)$$

d = Durchmesser eines Präzipitationshofes
In der HDL- Fraktion fand sich kein Apoliprotein B.

Alle Lipoprotein- Dichtefraktionen wurden auf Albumin mittels M-Partigen Albumin- Immundiffusionsplatten untersucht. Von einer quantitativen Bestimmung wurde abgesehen, da Albumin nur im Unterstand mit der Dichte D>1,225 zu finden war.

2.32 Ultrazentrifugation von diskontinuierlichen Gradienten mit dem Ausschwingrotor

In der Beckman-Ultrazentrifuge L5-50 wurde der Ausschwingrotor Typ SW 41, Beckman Instruments, INC., verwendet. Im folgenden wurde er SW - Rotor genannt.
Drei Lösungen verschiedener Dichte wurden in ein Zentrifugengefäß aus Cellulose-Acetat (Beckman Polyallomer Tubes No. 326814, Size $^5/_8$ dia x 3"), im folgenden CA-Tubes genannt, übereinander gegeben:

Zuunterst eine Serum-KBr-Lösung mit der Dichte D = 1,21g/ml, in der Mitte eine KBr-NaCl-Lösung mit der Dichte D = 1,o63 g/ml und oben eine NaCl-Lösung mit der Dichte D = 1,005 g/ml.

Um das Serum auf die Dichte D = 1,21 g/ml zu bringen, muß je ml Serum o,364 g KBr mit dem spezifischen Gewicht von 2,75 g/cm^3 zugewogen werden.

$$
\begin{aligned}
A \times 1{,}006 + B \times 2{,}75 &= (A + B) \times 1{,}21 \\
&= A \times 1{,}21 + B \times 1{,}21 \\
B \times (2{,}75 - 1{,}21) &= A \times (1{,}21 - 1{,}006) \\
\frac{B}{A} &= \frac{0{,}204}{1{,}54} \\
B/A &= 0{,}13246 \\
0{,}13246 \times 2{,}75 &= 0{,}364 \text{ (g KBr)}
\end{aligned}
$$

Da 4 ml Serum verwendet wurden, wurde 1,457 g KBr dazugegeben und gut durchmischt. Nach vollständiger Lösung wurde das Serum-KBr-Gemisch in ein CA-Tube umgefüllt.

Auf diesen Dichtegradienten wurde gemäß Abb. 1 ein zweiter Dichtegradient von 4 ml mit D = 1,063 g/ml vorsichtig (um ein Durchmischen zu verhüten) mittels 2o ml Spritze, Infusionspumpe, Infusionsschlauch und Kanüle Nr. 1 geschichtet.

Die KBr-NaCl-Lösung mit der Dichte D = 1,063 g/ml war bereits mit 0,15 mol NaCl- und einer KBr-Lösung der Dichte D = 1,225 g/ml (0,406 g KBr/ml H_2O) im Verhältnis 162:58 gemischt worden.

Als oberster Dichtegradient der Dichte D = 1,006 g/ml wurde das CA-Tube mit einer 0,15 mol NaCl-Lösung bis 2 mm unter die Tube-Öffnung gefüllt. Die Gummidichtungen der CA-Tubes wurden mit Silikon eingefettet, was ein luftdichtes Verschließen der Tubes ermöglichte und eine Verformung verhinderte.

Die so beschickten CA-Tubes wurden vorsichtig, um ein Durchmischen der drei Dichtegradienten zu vermeiden, in die Ausschwinggefäße des SW-Rotors eingeschoben, fest verschraubt und in den Rotor eingehängt. Dann wurde langsam bis auf 41000 U/min beschleunigt. Die Gesamtlaufzeit betrug 40 Stunden.

In den fertigen Präparationen ließen sich deutlich die Banden von VLDL, LDL, HDL und einem gelben Unterstand voneinander abgrenzen. Die Mitte zwischen zwei Banden wurde markiert, das CA-Tube in ein Beckman-Schneidegerät gesteckt und die Banden getrennt. Mit einer Pipette wurden die Banden abgehoben und deren Volumen mittels Meßglas festgestellt. Verunreinigungen von Banden durch darunterliegende wurden sorgfältig vermieden.

Wesentlich einfacher als beim FW-Rotor wurden die Serum-Lipoproteinkonzentrationen beim SW-Rotor wie folgt errechnet bei der quantitativen Proteinbestimmung nach LOWRY (siehe 2.33) :

$$SeK = E \times \frac{10}{\varepsilon_0} \times \frac{FrVol}{SeVol} \quad (mg\%)$$

SeK = Serumkonzentration einer Lipoproteinfraktion
E = gemessene Extinktion
ε_0 = Extinktionskoeffizient
FrVol = gemessenes Volumen des jeweiligen Überstandes einer Lipoprotein-Fraktion nach einem Ultrazentrifugationsdurchgang (UZD)
SeVol = Volumen des eingesetzten Serums beim 1.UZD (4ml)
d = Durchmesser der Präzipitationshöfe

Die Apoliprotein B- Serumkonzentrationen wurden aufgrund von Durchmessern der Präzipitationshöfe auf M-Partigen ß-Lipoprotein- Immundiffusionsplatten (siehe 2.34) für den SW- Rotor wie folgt berechnet:

$$SeK = (2{,}3 \times d^2 - 27{,}6) \times \frac{FrVol}{SeVol} \quad (mg\%)$$

Alle Lipoprotein- Dichtefraktionen wurden auf Albumin mittels M- Partigen Albumin- Immundiffusionsplatten untersucht. Von einer quantitativen Bestimmung wurde abgesehen, da Albumin nur im Unterstand mit der Dichte D = 1,21 g/ml zu finden war.

2.33 Quantitative Proteinbestimmung nach LOWRY

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach LOWRY (1951) in den verschiedenen Dichteklassen wurden zwei Lösungen verwendet.

Lösung C = 50 Teile 2%ige Na_2CO_3 in 0,1n NaOH
1 Teil 0,5%ige $CuSO_4$ x 5 H_2O in K-Na-Tartrat
Lösung D = 1 Teil H_2O
1 Teil Folin-Ciocaltens Phenolreagenz

190 µl 0,9%ige NaCl-Lösung und 1o µl der zu untersuchenden Proteinlösung wurden mit 2 ml frischer Lösung C gemischt und unter ständigem Schütteln nach 200 µl Lösung D hinzugegeben. Nach drei Minuten bei 37°C und weiteren 30 Minuten bei 20°C konnte bei 750 nm mit einem Photometer die Extinktion gemessen werden.Extinktionen über 0,8 verlangten weitere Verdünnungen.

Bei der Eichkurve wurden 0, 10, 20, 50, 100 und 150 µl einer Proteinlösung bekannter Konzentration (100 mg%) eingesetzt und auf 200 µl mittels 0,9%iger NaCl-Lösung aufgefüllt. Somit entsprachen 10 µl Proteinlösung 10 µg Protein. Die mittels Photometer gemessenen Extinktionen wurden in einem Koordinatensystem aufgetragen. Für jede Bestimmungsreihe ergab sich eine separate Eichkurve (Abb.3) mit sich unterscheidenden E_o-Werten.

2.34 Quantitative Bestimmung des Apolipoproteins B mittels M-Partigen ß-Lipoprotein- Immundiffusionsplatten.

Aus den einzelnen Dichtefraktionen nach Ultrazentrifugation wurden je 5 µl Lösung entnommen und mit Dispenser in die Ausstanzungen einer M-Partigen ß-Lipoprotein-Immundiffusionsplatte der Beringwerke AG, Frankfurt/M., im folgenden ß-Lipoprotein-Partigenplatte genannt, gegeben.

Als Eichlösung wurde eine Standard-ß-Lipoproteinlösung von 412mg% verwendet. Da nach LEES und ALAUPOVIC (1970) der Apoliprotein- B-Anteil mit annähernd 23% angesetzt werden kann, wurde diese Standard ß-Lipoproteinlösung von 412mg% in eine Apolipoprotein B-Lösung mit einer Konzentration von 94,76mg% umgerechnet. In geeigneter Weise mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt, wurden in die drei ersten Ausstanzungen einer ß-Lipoprotein Partigenplatte Apoliprotein B- Lösungen mit den Konzentrationen 94,76mg%, 47,38mg% und 23,69mg% gegeben.

Die ß-Lipoprotein Partigenplatten wurden bei Raumtemperatur zwei Tage inkubiert. Um die Ausstanzungen bildeten sich Präzipitationshöfe, deren Durchmesser mittels Fadenkreuzlupe gemessen wurden.

In der Eichkurve wurden die ß-Lipoprotein-Lösungskonzentrationen (LK) dem Quadrat der Präzipitationshofdurchmesser (d^2) ins Verhältnis gesetzt. Aus der Steigung der Eichkurve und deren Schnittpunkt mit der Abszisse konnte auf die Gleichung

$$LK = 2,3 \times d^2 - 27,6 \ (mg\%)$$

geschlossen werden. Mit dieser Gleichung wurden alle Lösungskonzentrationen von Apolipoprotein B berechnet.

2.35 Quantitative Bestimmung der Albumine mittels M-Partigen Albumin- Immundiffusionsplatten.

Nach Ultrazentrifugation wurden aus den einzelnen Dichtefraktionen je 5 µl Lösung mittels Dispenser entnommen und in die Stanzlöcher von M-Partigen Albumin-Immundiffusionsplatten der Beringwerke AG, Frankfurt/M., im folgenden Albumin-Partigenplatten genannt, gegeben.

Als Eichlösung diente eine Albuminlösung von 500 mg%. Eine Eichkurve konnte nicht angewendet werden, da in den Lipoprotein- Fraktionen VLDL, LDL und HDL von FW- und SW- Rotor kein Albumin nachgewiesen werden konnte. Albumin fand sich ausschließlich im Unterstand der Dichte D $>$ 1,225 g/ml.

3.0 Ergebnisse

Die durch Präparation mit Festwinkel- (FW) und Ausschwing-(SW) Rotor bei quantitativer Proteinbestimmung nach LOWRY und bei quantitativer Bestimmung des Apolipoproteins B mittels M-Partigen ß-Lipoprotein- Immundiffusionsplatten errechneten Serumkonzentrationen sind in Tab. 4-8 aufgeführt.

3.1 Vergleich der Proteinkonzentrationen, ermittelt durch Präparation mittels Festwinkel- (FW) und Ausschwing- (SW) Rotor

Die Proteinkonzentrationen eines Untersuchungstages wurden von beiden Rotortypen als Wertepaar genommen und in die Koordinatensysteme (Abb. 4-8) eingezeichnet.

Es zeigte sich in der VLDL- und LDL- Fraktion bei der Proteinbestimmung nach LOWRY (Abb. 4 und 5) eine gleichmäßige Verteilung um die 45^{o}-Achse, d.h., daß FW- und SW-Rotor vergleichbare Werte lieferten. Auch bei der Apolipoprotein B-Bestimmung mittels ß- Lipoprotein-Partigenplatten (Abb. 8) zeigte sich in der LDL-Fraktion eine gleichmäßige Streuung um die 45^{o}-Achse. Dagegen waren die Werte in der VLDL-Fraktion bei der Bestimmung mittels ß-Lipoprotein Partigenplatten (Abb. 7) bei der Präparation mit dem SW-Rotor ohne Ausnahme höher als bei der Präparation mit dem FW-Rotor. In der HDL-Fraktion zeigten sich bei der Proteinbestimmung nach LOWRY (Abb. 6) fast ausnahmslos kleinere Werte als bei der Präparation mit dem FW-Rotor.

3.2 Vergleich der Reproduzierbarkeit der Proteinkonzentrationen ermittelt durch Präparation mittels Festwinkel- (FW) und Ausschwing- (SW) Rotor.

Abgesehen von individueller Schwankung müssen die Serum-

Lipoproteinkonzentrationen, die aufgrund der Blutabnahme drei Tage vor Ende einer Formeldiätperiode ermittelt wurden, durch die der Blutabnahme am letzten Tag einer Formeldiätperiode reproduzierbar sein. Als Maß diente dafür die Standardabweichung (s) und der Variationskoeffizient (V), bzw. das arithmetische Mittel dieser Ergebnisse über die sechs Versuchspersonen und die drei Formeldiäten mit Normalkost. Die Standardabweichung errechnete sich hier nach der Formel

$$s = \sqrt{\frac{(xj-\bar{x})^2}{n}}$$

da es sich nur um je zwei Ausgangswerte handelte (Tab.9 und 10).

Bei der Proteinbestimmung nach der Methode LOWRY (Abb. 9) zeigten sich in der VLDL-Fraktion etwa gleich hohe mittlere Proteinkonzentrationen für die Präparation mit FW- Rotor (26,4 mg%) und SW-Rotor (24 mg%). Der mittlere Variationskoeffizient war mit 0,14 für die Präparation mit FW-Rotor niedriger als für die des SW-Rotors (0,21). Auch in der LDL-Fraktion wurden etwa gleich hohe mittlere Proteinkonzentrationen für die Präparation mit FW-Rotor (96,2 mg%) und SW-Rotor (88,6 mg%) ermittelt. Der mittlere Variationskoeffizient war mit 0,09 für die Präparation mit dem FW-Rotor fast gleich wie für die des SW-Rotors (0,10). In der HDL-Fraktion fanden sich wesentlich höhere mittlere Proteinkonzentrationen bei der Präparation mit FW-Rotor (290,1 mg%) als bei der mit SW-Rotor (191,3 mg%). Der mittlere Variationskoeffizient lag für die Präparation mit FW-Rotor mit 0,16 wesentlich über der des SW-Rotors (0,07).

Bei der Apolipoprotein B-Bestimmung mittels ß-Lipoprotein Partigenplatten (Abb. 9) fanden sich in der VLDL-Fraktion für die Präparation mit dem FW-Rotor (2,6mg%) etwa halb so hohe mittlere Proteinkonzentrationen wie für die mit dem SW-Rotor (5,4mg%). Dagegen waren die mittleren Variationskoeffizienten für die Präparation mittels beider Rotor-Typen mit 0,25 gleich hoch. In der LDL-Fraktion wurden etwa gleich hohe mittlere Konzentrationen am Apolipoprotein B für die Präparation mit FW-Rotor (72,5mg%) und SW-Rotor (77,1mg%) ermittelt. Der mittlere Variationskoeffizient war mit 0,07 für die Präparation mit FW-Rotor fast gleich wie für die mit dem SW-Rotor (0,06).

Differenziert nach Proteinbestimmung mittels Methode LOWRY und nach Apolipoprotein B-Bestimmung mittels ß-Lipoprotein Partigenplatten zeigten sich in der VLDL-Fraktion bei der Methode LOWRY mit 0,14 (FW-Rotor), bzw. 0,21 (SW-Rotor) kleinere Variationskoeffizienten als bei ß-Lipoprotein Partigenplatten (für beide Rotor-Typen je 0,25). In der LDL-Fraktion ergaben sich für die Proteinbestimmung mittels Methode LOWRY mit 0,09 (FW-Rotor), bzw. 0,10 (SW-Rotor) höhere Variationskoeffizienten als bei der Apolipoprotein B-Bestimmung mittels ß-Lipoprotein Partigenplatten (0,07 beim FW-Rotor und 0,06 beim SW-Rotor).

3.3 Bestimmung von Apolipoprotein B und Albumin mittels M-Partigen Immundiffusionsplatten als Parameter für die Reinheit der Präparation beim Festwinkel- und Ausschwingrotor.

Nachdem Apolipoprotein B ausschließlich Bestandteil der VLDL- und LDL-Fraktion ist, kann die Bestimmung der Apolipoprotein B-Konzentration mittels M-Partigen ß-Lipoprotein Immundiffusionsplatten in der HDL-Fraktion und im Unterstand zur Bewertung der Reinheit der Präparation beim Festwinkel- und Ausschwing-Rotor verwendet werden:
Es zeigte sich, daß nach keiner Präparation bei beiden Rotor-Typen sich Apolipoprotein B in der HDL-Fraktion und im Unterstand nachweisen ließ.

Albumin ist nur Bestandteil des Unterstandes. Es zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, daß ausschließlich im Unterstand nach Präparation mit beiden Rotor-Typen Albumin nachgewiesen werden konnte.

3.4 Beeinflußbarkeit der Lipoproteinkonzentrationen durch die Formeldiäten II, V und VII

Da mit der quantitativen Proteinbestimmung nach LOWRY in der VLDL-Fraktion mit geringerer Streuung (kleineren Variationskoeffizienten) gemessen wurde und auch die Apoliproteine A und C mitgemessen wurden, dagegen die fast ausschließlich aus Apolipoprotein B bestehende LDL-Fraktion mittels ß-Lipoprotein Partigenplatten mit geringerer Streuung gemessen wurde, wird im folgenden auf diese Werte eingegangen. Die Proteine der HDL-Fraktion wurden nur nach der Methode LOWRY gemessen. Die Werte für die einzelnen Formeldiäten und für die Normalkost aus den Präparationen von FW- und SW-Rotor wurden gemittelt (Tab. 9 und Abb. 10 und 11).

Ausgehend von der mittleren Proteinkonzentration in der VLDL-Fraktion bei Normalkost von 31,8mg% reduzierte sich die Proteinkonzentration unter Formeldiät II und V auf 24,2mg%, bzw. 24,1mg% und unter Formeldiät VII sogar auf 20,7mg%. Die mittlere Proteinkonzentration in der LDL-Fraktion war unter Normalkost 89,4mg% und reduzierte sich unter Formeldiät II auf 73,9mg%, unter Formeldiät V auf 70,5mg% und unter Formeldiät VII sogar auf 65,5mg%.
In der HDL-Fraktion stieg die mittlere Proteinkonzentration von 216,8mg% unter Normalkost mit Formeldiät II auf 232,3mg%, unter Formeldiät V auf 264,7mg% und unter Formeldiät VII auf 249mg%.

4.0 Diskussion

Die quantitative Bestimmung der Serumlipoproteine ist wegen der großen Bedeutung der Arteriosklerose und der koronaren Herzkrankheit wichtig. Viele Autoren bedienten sich der Technik der Ultrazentrifugation; allerdings wurde in den meisten Fällen entweder die stufenweise Ultrazentrifugation im Festwinkel-Rotor oder die Ultrazentrifugation von diskontinuierlichen Gradienten im Ausschwing-Rotor verwendet.

Vergleicht man die Präparationen beider Rotor-Typen, so waren die Lipoproteinkonzentrationen, nach der Methode LOWRY gemessen, in der VLDL- Fraktion etwa gleich hoch, wobei der Variationskoeffizient als Maß der Streuung beim FW-Rotor geringer war als beim SW-Rotor. Die Ausbeute an Apolipoprotein B, gemessen mittels ß-Lipoprotein Partigenplatten, war in der VLDL- Fraktion beim SW-Rotor etwa doppelt so hoch wie beim FW-Rotor. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen HOJNACKI et al. (1978), die bei der Präparation von Primatenserum mittels SW-Rotor eine größere Ausbeute an VLDL- Partikeln (gemessen mittels Agarosegel - Elektrophorese) feststellten als mittels FW-Rotor. Die Ausbeute an großen VLDL-Partikeln (gemessen mittels Elektronenmikroskop) war beim SW-Rotor höher, was auf geringeres Anhaften von großen Lipoproteinpartikeln an den CA- Tube-Wänden beim SW-Rotor zurückgeführt wurde. Da Apolipoprotein B nur ein Teil der aus Apolipoprotein A, B und C bestehenden VLDL- Fraktion ist, war die Konzentration des Apolipoprotein B auch nur ein Bruchteil der nach der Methode LOWRY gemessenen Lipoprotein- Konzentrationen der VLDL- Fraktion.

In der LDL- Fraktion waren die nach der Methode LOWRY gemessenen Lipoproteinkonzentrationen bei beiden Rotor-Typen miteinander vergleichbar, ebenso die mit ß-Lipoprotein Partigenplatten gemessenen Konzentrationen des Apolipoprotein B. Jedoch zeigten sich bei der Bestimmung des Apolipo-

protein B mittels ß- Lipoprotein Partigenplatten niedrigere Variationskoeffizienten.

Die gemittelten Lipoproteinkonzentrationen beider Rotor-Typen, nach der Methode LOWRY gemessen, waren etwas höher als die Konzentrationen des Apolipoprotein B, gemessen mittels ß-Lipoprotein Partigenplatten. ALBERS et al. (1975) errechnete einen Korrekturfaktor von 0,82 zur Berechnung der Konzentrationen von Apolipoprotein B aus LDL- Lipoproteinkonzentrationen, gemessen nach der Methode LOWRY. Die gemittelten Lipoproteinkonzentrationen beider Rotor-Typen, nach der Methode LOWRY gemessen, ergaben in der vorliegenden Arbeit mit dem fast identischen Korrekturfaktor 0,81 die über beiden Rotor-Typen gemittelten Konzentrationen des Apolipoprotein B, gemessen mittels ß-Lipoprotein Partigenplatten. Dieser Korrekturfaktor kam hier nicht zur Anwendung.

Die Lipoprotein-Konzentrationen in der HDL-Fraktion, nach der Methode LOWRY gemessen, waren beim FW-Rotor fast ausnahmslos höher als beim SW-Rotor. Auch der Variationskoeffizient war beim FW-Rotor wesentlich höher, da beim FW-Rotor die Dichte der HDL-Fraktion bis 1,225 g/ml ging, während sie beim SW-Rotor nur bis 1,210 g/ml ging. Somit waren mehr Serumproteine, die im Unterstand zu finden sind, beim FW- Rotor in die HDL-Fraktion gewandert als beim SW-Rotor.

Da bei beiden Rotor - Typen Apolipoprotein B mittels ß-Lipoprotein Partigenplatten ausschließlich in der VLDL- und LDL-Fraktion gefunden wurde, die HDL- Fraktion und der Unterstand aber kein Apolipoprotein B enthielt, läßt darauf schließen, daß alles Apolipoprotein B des Serums gemessen wurde. Albumin, gemessen mittels Albumin Partigenplatten, fand sich bei beiden Rotor - Typen ausschließlich im Unterstand. Dies ist ein Beweis des sauberen Trennvermögens beider Rotor- Typen.

Vergleicht man die beiden Rotor - Typen, so hat der FW-Rotor den Vorteil, daß doppelt so viel Serum verwendet werden kann wie beim SW-Rotor. Auch ist die Präparation beim FW- Rotor einfacher und gegen Erschütterung und Unachtsamkeit weniger anfällig; kollabiert ein CN- Tube, so kann die in ihr enthaltene Lösung bei einer weiteren Präparation wieder verwendet werden. Will man nun die VLDL - Fraktion von Serum getrennt haben, ist der FW- Rotor zwar wegen seiner einfachen Präparation vorteilhaft, doch ist die Ausbeute an großen VLDL- Partikeln nach HOJNACKI (1978) beim SW- Rotor besser. Der entscheidende Vorteil bei der Präparation mit dem SW- Rotor ist, daß drei Lipoproteindichteklassen (VLDL, LDL und HDL) vom Unterstand in einem Arbeitsgang mit dem halben Zeitaufwand getrennt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels SW- Rotor 40 Stunden ultrazentrifugiert. Nach REDGRAVE et al. (1975) genügen sogar schon 24 Stunden Ultrazentrifugation mittels SW-Rotor, um die gleichen Ergebnisse zu erzielen. Im Gegensatz dazu sind beim FW-Rotor drei Arbeitsgänge notwendig. Durch den geringeren Zeitaufwand beim SW- Rotor sind auch weniger Veränderungen der Lipoproteine zu erwarten. Dagegen wird beim SW-Rotor weniger Serum verwendet. Auf die Schichtung der Dichtegradienten, das Beschicken der Ultrazentrifuge mit den CA- Tubes, die Ultrazentrifugation selbst und das Schneiden der Dichtefraktionen ist erheblich mehr Sorgfalt zu verwenden als es bei der Präparation mittels FW- Rotor der Fall zu sein hat. Kollabiert ein CA- Tube beim SW- Rotor, so ist die Präparation verloren.

Die technisch und biochemisch elegantere Methode ist die Präparation mittels SW- Rotor, die aber erhöhte Sorgfalt erfordert. Für weniger Geübte dürfte der FW- Rotor von Vorteil sein, auch wenn der Zeitaufwand doppelt so hoch ist wie beim SW-Rotor und für die Gewinnung der vier Dichteklassen drei Arbeitsgänge notwendig sind.

Die Beeinflußbarkeit des Lipoproteinmusters durch diäteti-

sche Maßnahmen wurde mehrfach bei unterschiedlicher Fragestellung untersucht. Für die Pathogenese der Arteriosklerose spielt ein hoher VLDL- und LDL- Spiegel eine dominierende Rolle, während ein hoher HDL- Spiegel eine protektive Wirkung hat. Zahlreiche Autoren (SCHLIERF und WOLFRAM, FREDRICKSON, HULLEY, AHRENS, GROEN, KINSELL, EDERER, MEITTINEN) haben bewiesen, daß es mit Hilfe von Diäten gelingt, den Cholesterin- und Triglycerid- Spiegel bei Hyperlipidämien zu senken. HJERMANN et al. und HULLEY wiesen nach, daß speziell der LDL- Spiegel gesenkt werden konnte, ohne gleichzeitig auch den HDL- Spiegel zu senken. GOKAL wies nach, daß bei Hämodialysefällen, bei denen die Patienten an Hyperlipidämie litten, ein Abfall der Triglyceride mit Hilfe einer ungesättigte Fettsäuren enthaltenden Diät zu erreichen ist. Auch KUO et al. fanden den hypolipämischen Effekt einer polyensäurereichen Diät bestätigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs freiwillige Versuchspersonen mit drei Formeldiäten in unterschiedlicher Reihenfolge ernährt, wobei die Zusammensetzung des Fettanteils der Formeldiäten durch unterschiedlich hohen Prozentsatz einfach und mehrfach ungesättigter Fettsäuren gekennzeichnet war. Unter der Formeldiät, die prozentual den höchsten Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthielt (Formeldiät VII), war der stärkste Abfall der VLDL- und LDL- Konzentration festzustellen. Die HDL- Konzentration stieg am stärksten unter den Formeldiäten V und VII, die den höchsten Anteil an einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthielten.

5.0 Zusammenfassung

Die Arteriosklerose und die koronare Herzkrankheit sind mit einem hohen VLDL- und LDL-Spiegel sowie einem niedrigen HDL-Spiegel korreliert. Zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Lipoproteinfraktionen ist die Präparation mittels Ultrazentrifugation nötig. Der hohe zeitliche Aufwand bei stufenweiser Ultrazentrifugation mittels Festwinkel-Rotor läßt sich bei der Präparation durch diskontinuierliche Gradienten im Ausschwing-Rotor auf die Hälfte reduzieren.

Es konnte gezeigt werden, daß in der VLDL-Fraktion bei beiden Präparationsarten etwa gleich hohe Lipoproteinkonzentrationen gemessen werden. Die Präparation von diskontinuierlichen Gradienten im Ausschwing-Rotor lieferte höhere Werte an Apolipoprotein B. In der LDL-Fraktion bestand eine gute Übereinstimmung und geringe Streuung bei beiden Präparationsmethoden. Die Lipoproteinkonzentrationen in der HDL-Fraktion waren bei der stufenweisen Ultrazentrifugation mittels Festwinkel-Rotor höher, da der Dichtebereich hier weiter gewählt wurde als bei der Präparation von diskontinuierlichen Gradienten im Ausschwing-Rotor.

Beide Präparationsmethoden trennten sauber die einzelnen Lipoprotein-Dichteklassen; denn Albumin konnte ausschließlich im Unterstand und Apolipoprotein B ausschließlich in der VLDL- und LDL-Fraktion nachgewiesen werden.

In einem Formeldiätversuch mit sechs freiwilligen Versuchspersonen konnte gezeigt werden, daß unter der Formeldiät, die prozentual den höchsten Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren aufwies, der stärkste Abfall der VLDL- und LDL-Fraktion erzielt wurde. Der höchste Anstieg der HDL- Konzentration konnte mit den zwei Formeldiäten erreicht werden, die den höchsten Anteil einfach und mehrfach ungesättigter Fettsäuren aufwiesen.

6.0 Anhang

Tab.1 Versuchspersonen

Versuchs-person	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Größe (cm)	tägl.Energie-aufnahme (J)
A	25	68,o	172	8,o16
B	23	70,o	182	1o.833
C	23	59,2	174	12.331
D	23	90,o	187	12.44o
E	26	80,o	184	12.524
F	23	50,7	160	7.823

Tab.2 Fettanteil der Formeldiäten (II, V und VII)

	II (Unilever)	V (Olivenöl)	VII (Distelöl)
Hauptbestandteil des Fettanteils	Palmitin-säure	Öl-säure	Linol-säure
gesättigte: ungesättigte Bindungen	16:0	18:1	18:2
% gesättigter	68	32	31
% einfach unges.	11	58	12
% mehrfach unges. Bindungen	21	10	57

Tab.3 Reihenfolge der Perioden der Formeldiäten (II, V und VII) und der Normalkost (NK) für je zwei der Versuchspersonen (A-F)

Versuchs-personen	1. Periode	2. Periode	3. Periode	4. Periode
A/B	VII	II	V	NK
C/D	II	V	VII	NK
E/F	V	VII	II	NK

Tab.4 Proteinkonzentrationen (mg%) in der VLDL-Fraktion für die Versuchspersonen A-F bei der quantitativen Proteinbestimmung nach LOWRY für den ersten und zweiten Versuchstag, welche durch Präparation mit dem Fest-Winkel-(FW) und Ausschwing (SW) Rotor erhalten wurden. Die Werte wurden nach Normalkost (NK) und den Formeldiäten (II, V und VII) geordnet.

	NK	II	V	VII
A FW_1	19,0	21,3	20,7	18,9
FW_2	21,0	25,6	24,6	36,0
SW_1	15,9	41,8	31,1	23,8
SW_2	18,6	29,6	19,7	23,8
B FW_1	49,3	19,9	26,4	16,0
FW_2	52,5	27,0	34,0	28,6
SW_1	38,3	27,5	27,4	19,9
SW_2	55,5	25,0	13,3	11,9
C FW_1	39,1	22,9	23,4	16,7
FW_2	33,8	24,9	23,5	17,8
SW_1	24,0	13,3	13,2	24,7
SW_2	41,1	13,5	14,6	9,5
D FW_1	37,9	19,3	26,3	17,4
FW_2	32,7	34,5	55,6	24,9
SW_1	29,5	31,4	29,6	38,2
SW_2	35,4	17,5	59,4	6,9
E FW_1	26,4	34,0	13,6	20,4
FW_2	21,0	18,3	18,4	20,2
SW_1	26,5	19,3	6,7	19,1
SW_2	29,2	5,8	6,0	12,3
F FW_1	21,4	25,0	20,1	21,2
FW_2	27,3	27,9	28,6	29,4
SW_1	41,3	33,2	19,9	15,7
SW_2	24,0	20,7	21,4	22,1

Tab.5 Proteinkonzentrationen (mg%) in der LDL- Fraktion für die Versuchspersonen A-F bei der quantitativen Proteinbestimmung nach LOWRY für den ersten und zweiten Versuchstag, welche durch Präparation mit dem Festwinkel- (FW) und Ausschwing- (SW) Rotor erhalten wurden. Die Werte wurden nach Normalkost (NK) und den Formeldiäten (II, V und VII) geordnet.

	NK	II	V	VII
A FW_1	69,4	82,8	87,2	82,0
FW_2	9o,7	88,1	83,3	117,1
SW_1	66,1	66,0	1o2,4	89,8
SW_2	82,2	92,4	93,2	82,5
B FW_1	125,8	104,2	161,7	83,2
FW_2	141,5	92,6	107,9	130,5
SW_1	116,0	99,6	112,8	107,0
SW_2	151,7	104,2	113,2	89,8
C FW_1	53,9	84,9	67,4	98,0
FW_2	47,6	69,2	61,9	70,7
SW_1	51,3	40,6	57,2	59,9
SW_2	52,4	55,6	63,4	50,8
D FW_1	80,7	83,9	86,9	154,8
FW_2	69,8	93,6	92,7	94,0
SW_1	47,9	78,6	73,7	109,5
SW_2	69,7	69,4	91,0	87,4
E FW_1	86,5	156,5	89,6	112,0
FW_2	73,1	91,0	89,4	105,0
SW_1	80,7	107,0	83,3	127,5
SW_2	128,5	84,9	91,7	113,1
F FW_1	112,9	84,5	119,0	115,4
FW_2	124,5	76,4	121,6	100,9
SW_1	102,9	115,6	124,4	98,2
SW_2	59,7	102,4	96,2	105,0

Tab. 6 Proteinkonzentrationen (mg%) in der HDL- Fraktion für die Versuchspersonen A-F bei der quantitativen Proteinbestimmung nach LOWRY für den ersten und zweiten Versuchstag, welche durch Präparation mit dem Festwinkel- (FW) und dem Ausschwing- (SW) Rotor erhalten wurden. Die Werte wurden nach Normalkost (NK) und den Formeldiäten (II, V und VII) geordnet.

	NK	II	V	VII
A FW_1	353,1	244,4	312,0	355,4
FW_2	183,7	169,6	227,0	274,2
SW_1	120,9	146,6	153,2	158,7
SW_2	155,0	152,2	141,7	173,6
B FW_1	369,4	361,8	395,8	330,1
FW_2	186,4	268,3	269,7	311,4
SW_1	153,3	111,6	161,1	188,8
SW_2	177,6	184,6	190,2	157,2
C FW_1	298,5	309,6	347,8	282,3
FW_2	207,8	245,8	-	198,3
SW_1	146,7	160,0	173,5	171,6
SW_2	175,6	158,7	196,1	151,9
D FW_1	361,7	325,0	224,0	285,2
FW_2	179,1	288,9	274,3	206,4
SW_1	152,2	186,7	223,1	2o3,2
SW_2	190,2	184,9	224,7	186,2
E FW_1	325,9	299,5	310,6	264,3
FW_2	208,9	223,1	299,2	385,5
SW_1	170,5	195,6	230,5	178,8
SW_2	220,5	177,8	225,3	228,6
F FW_1	239,1	351,6	441,2	418,9
FW_2	224,0	350,5	336,6	249,9
SW_1	196,2	236,1	284,2	242,6
SW_2	205,8	241,7	363,0	252,0

Tab.7 Proteinkonzentrationen (mg%) in der VLDL-Fraktion für die Versuchspersonen A-F bei der quantitativen Apolipoprotein B-Bestimmung mittels M-Partigen ß- Lipoprotein-Immundiffusionsplatten für den ersten und zweiten Versuchstag, welche durch Präparation mit dem Festwinkel-(FW) und dem Ausschwing-(SW) Rotor erhalten wurden. Die Werte wurden nach Normalkost (NK) und den Formeldiäten (II, V und VII) geordnet.

	NK	II	V	VII
A FW_1	3,1	4,6	3,3	-
FW_2	1,2	1,4	1,2	-
SW_1	4,8	5,9	5,3	-
SW_2	7,7	5,4	8,6	-
B FW_1	4,3	2,3	2,9	-
FW_2	6,8	1,4	2,7	-
SW_1	7,6	2,4	4,1	-
SW_2	10,1	5,2	6,4	-
C FW_1	2,6	-	2,3	2,4
FW_2	2,9	-	2,7	2,7
SW_1	3,7	-	2,5	6,2
SW_2	6,4	-	2,6	6,2
D FW_1	3,6	-	-	4,0
FW_2	1,2	-	5,3	2,6
SW_1	6,1	-	6,8	8,4
SW_2	7,4	-	7,8	8,0
E FW_1	0,3	1,0	-	1,0
FW_2	0,4	0,3	-	1,9
SW_1	0,5	0,5	-	3,6
SW_2	6,9	4,0	-	1,5
F FW_1	0,7	4,0	-	1,7
FW_2	3,3	4,5	-	2,7
SW_1	2,3	6,2	-	3,2
SW_2	4,3	8,7	-	7,5

Tab.8 Proteinkonzentrationen (mg%) in der LDL-Fraktion für die Versuchspersonen A-F bei der quantitativen Apolipoprotein-B- Bestimmung mittels M-Partigen ß- Lipoprotein-Immundiffusionsplatten für den ersten und zweiten Versuchstag, welche durch Präparation mit dem Festwinkel-(FW) und dem Ausschwing-(SW) Rotor erhalten wurden. Die Werte wurden nach Normalkost (NK) und den Formeldiäten (II, V und VII) geordnet.

	NK	II	V	VII
A FW_1	88,9	77,6	79,1	-
FW_2	77,5	66,8	80,5	-
SW_1	86,7	75,1	81,6	-
SW_2	97,0	74,2	75,0	-
B FW_1	121,2	70,0	75,0	-
FW_2	103,2	65,6	90,7	-
SW_1	121,1	77,8	84,0	-
SW_2	128,5	127,5	92,7	-
C FW_1	60,2	-	53,7	38,4
FW_2	45,2	-	44,4	41,4
SW_1	50,9	-	44,6	44,0
SW_2	48,2	-	53,4	42,0
D FW_1	84,2	--	62,1	71,0
FW_2	74,3	-	66,0	61,6
SW_1	84,9	-	71,3	76,4
SW_2	66,7	-	73,2	73,6
E FW_1	85,1	71,8	-	78,5
FW_2	104,4	80,4	-	68,2
SW_1	92,6	71,4	-	79,4
SW_2	126,3	76,3	-	78,7
F FW_1	95,0	60,1	-	76,1
FW_2	120,1	68,8	-	65,5
SW_1	109,5	73,7	-	80,8
SW_2	72,2	91,1	-	71,3

konzentrationen (mg%), die aufgrund der Blutabnahmen drei Tage vor Ende und am letzten Tag einer Formeldiätperiode (NK, II, V und VII) bestimmt wurden, gemittelt über die sechs Versuchspersonen. Zum Vergleich wurden die Werte nach Präparation mit Festwinkel-(FW) und Ausschwing-(SW) Rotor sowie die Proteinbestimmung mittels Methode LOWRY (L) und mittels M-Partigen ß-Lipoprotein- Immundiffusionsplatten getrennt aufgeführt (P).

		NK			II			V			VII		
		$\bar{x}$	s	V	$\bar{x}$	s	V	$\bar{x}$	s	V	$\bar{x}$	s	V
L	VLDL/FW	31,8	2,3	0,08	25,1	4,0	0,15	26,3	4,6	0,15	22,3	3,9	0,16
	SW	31,7	5,3	0,15	23,3	4,6	0,21	21,9	4,9	0,18	19,0	5,7	0,30
	LDL/FW	89,7	6,6	0,08	92,4	9,7	0,09	97,4	6,0	0,05	105,3	16,0	0,15
	SW	84,1	13,8	0,16	84,7	7,6	0,10	92,0	5,8	0,07	93,4	6,4	0,07
	HDL/FW	261,5	63,2	0,24	286,5	28,8	0,11	315,5	37,8	0,12	296,4	46,1	0,16
	SW	172,1	15,4	0,09	178,1	8,8	0,06	213,9	12,4	0,05	201,1	11,9	0,06
P	VLDL/FW	2,5	0,8		2,5	0,6		3,2	0,3		2,4	0,5	
	SW	5,7	1,5		4,8	1,2		5,5	0,8		5,6	0,9	
	LDL/FW	88,3	8,2		70,1	4,1		68,9	3,8		62,6	4,2	
	SW	90,4	9,2		77,6	3,4		72,0	3,2		68,3	1,9	

Tab.10 Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (s) und Variationskoeffizienten (V) der Lipoproteinkonzentrationen (mg%), die aufgrund der Blutentnahmen drei Tage vor Ende und am letzten Tag einer Formeldiätperiode bestimmt wurden, gemittelt über die sechs Versuchspersonen und die drei Formeldiätperioden mit Normalkost. Zum Vergleich wurden die Werte nach Präparation mit dem Festwinkel- (FW) und Ausschwing- (SW) Rotor getrennt aufgeführt.

Proteinbestimmung nach der Methode LOWRY.

		VLDL	LDL	HDL
FW	$\bar{x}$	26,4	96,2	290,1
	s	3,7	9,6	44,0
	V	0,14	0,09	0,16
SW	$\bar{x}$	24,0	88,6	191,3
	s	5,1	8,4	12,1
	V	0,21	0,1	0,07

Bestimmung des Apolipoprotein B mittels M-Partigen ß-Lipoprotein- Immundiffusionsplatten

		VLDL	LDL
FW	$\bar{x}$	2,6	72,5
	s	0,6	5,1
	V	0,25	0,07
SW	$\bar{x}$	5,4	77,1
	s	1,1	4,4
	V	0,25	0,06

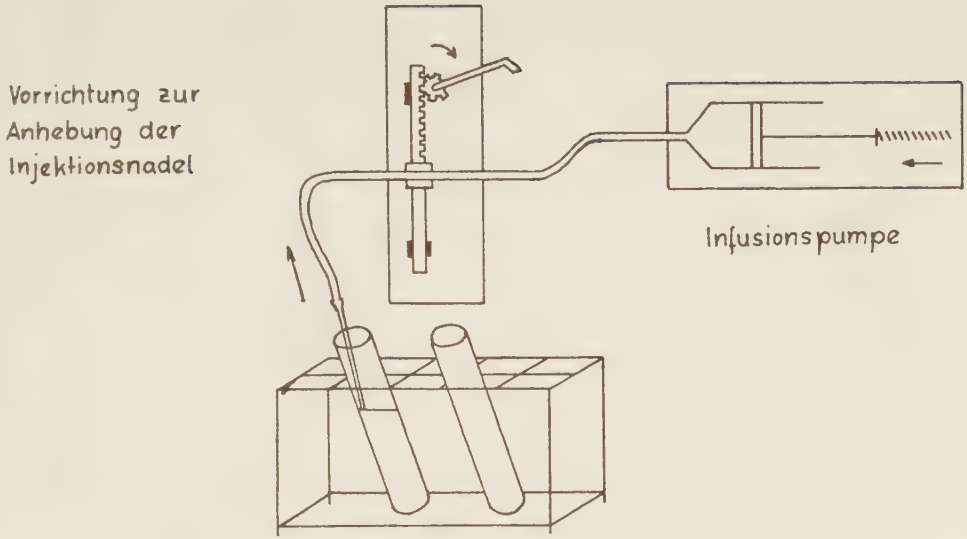

Abb. 1 Schichtung von diskontinuierlichen Dichtegradienten bei der Präparation mittels Ausschwing-Rotor

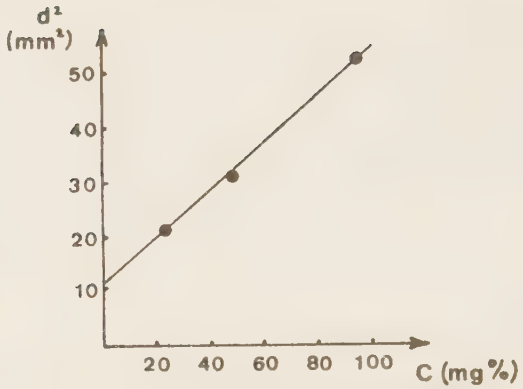

Abb.2 Eichkurve zur quantitativen Bestimmung des Apolipoprotein B mittels M-Partigen ß-Lipoprotein Immundiffusionsplatten

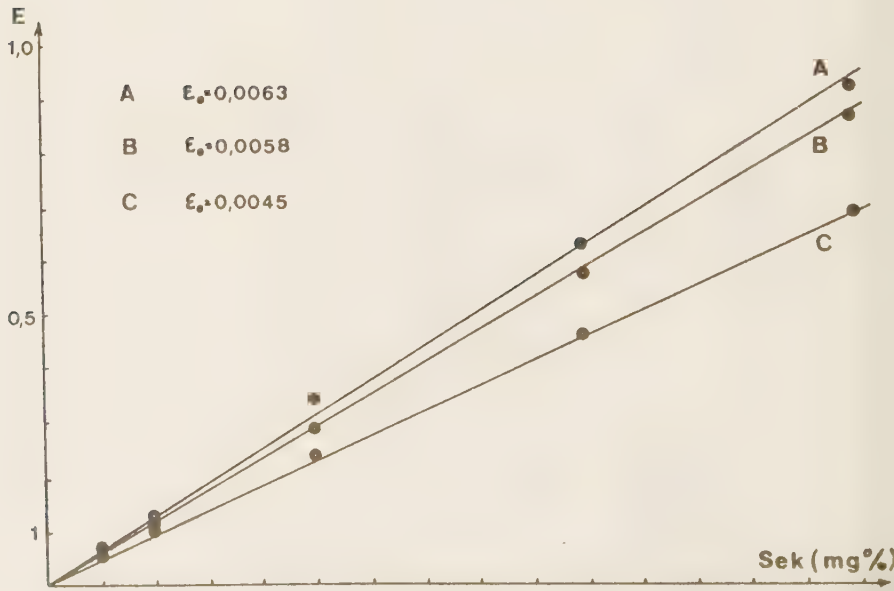

Abb.3 Eichkurven zur quantitativen Proteinbestimmung nach LOWE für die erste (A), zweite (B) und dritte (A) Formeldiät-periode sowie für die Normalkostperiode (C)

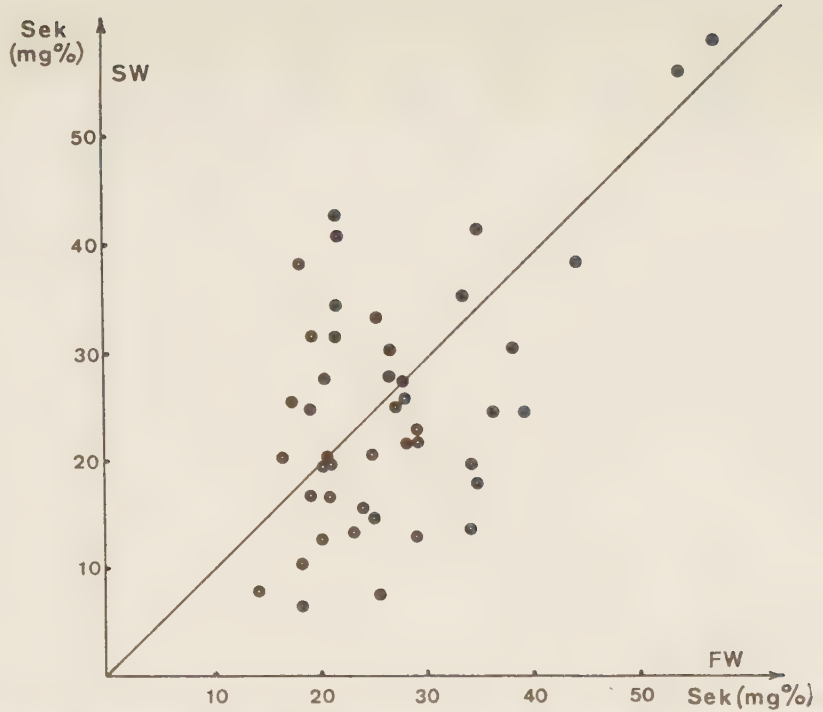

Abb.4 Streuung der Serumlipoproteinkonzentrationen (Sek) der VLDL-Fraktion gemäß Tab.4, erhalten nach Präparation mit Festwinkel- (FW) und Ausschwing- (SW) Rotor bei der quantitativen Proteinbestimmung nach LOWRY

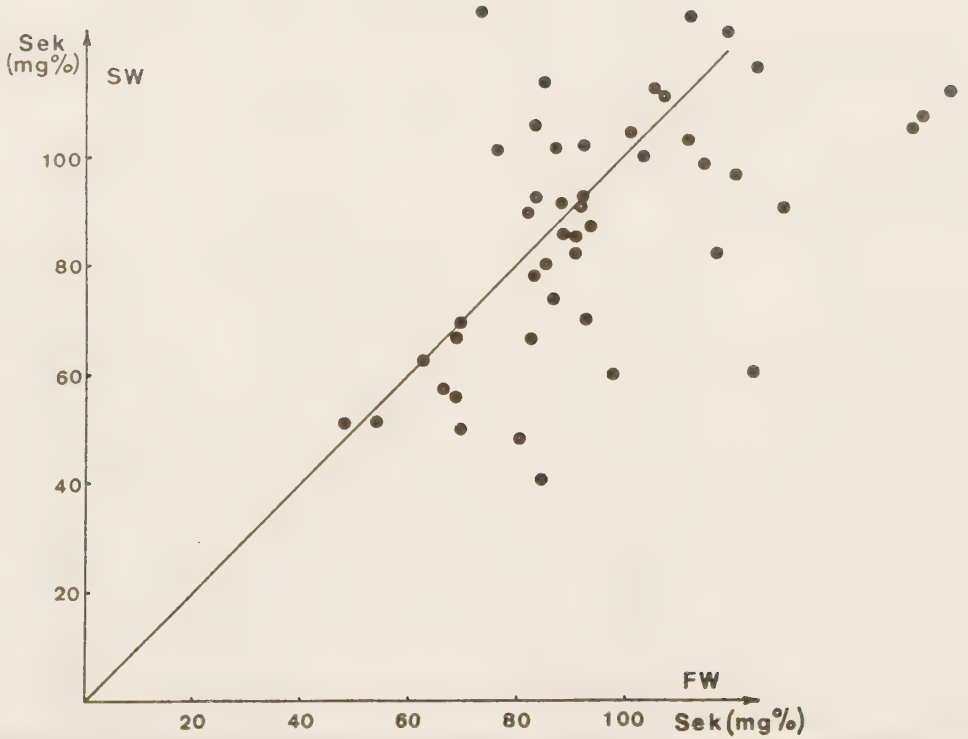

Abb.5 Streuung der Serumlipoproteinkonzentrationen (Sek) der LDL-Fraktion gemäß Tab.5, erhalten nach Präparation mit Festwinkel- (FW) und Ausschwing- (SW) Rotor bei der quantitativen Proteinbestimmung nach LOWRY. Ein Korrekturfaktor kam nicht zur Anwendung (s.Diskussion S. 21)

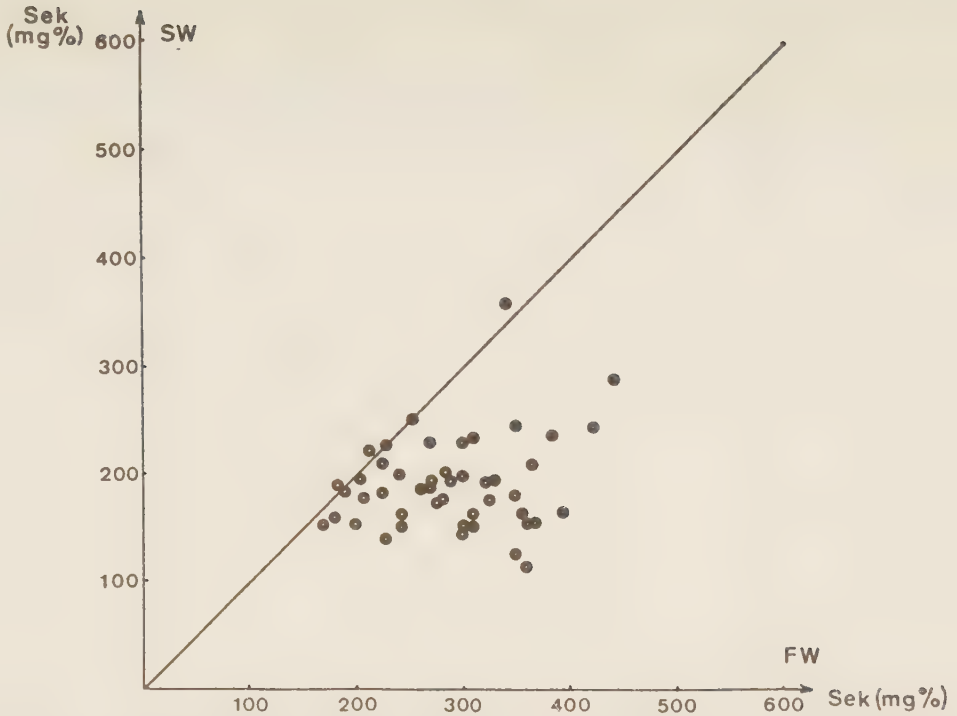

Abb.6 Streuung der Serumlipoproteinkonzentrationen (SeK) der HDL - Fraktion gemäß Tab. 6 erhalten nach Präparation mit Festwinkel- (FW) und Ausschwing - (SW) Rotor bei der quantitativen Proteinbestimmung nach LOWRY

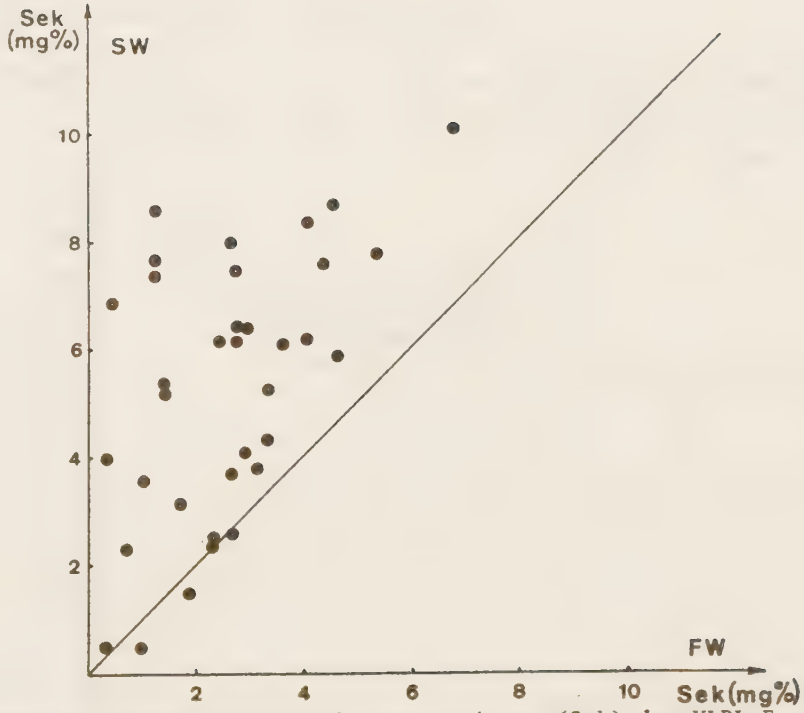

Abb.7 Streuung der Serumlipoproteinkonzentrationen (Sek) der VLDL-Fraktion gemäß Tab.7, erhalten nach Präparation mit Festwinkel- (FW) und Ausschwing- (SW) Rotor bei der quantitativen Bestimmung des Apolipoprotein B mittels M-Partigen ß-Lipoprotein Immundiffusionsplatten.

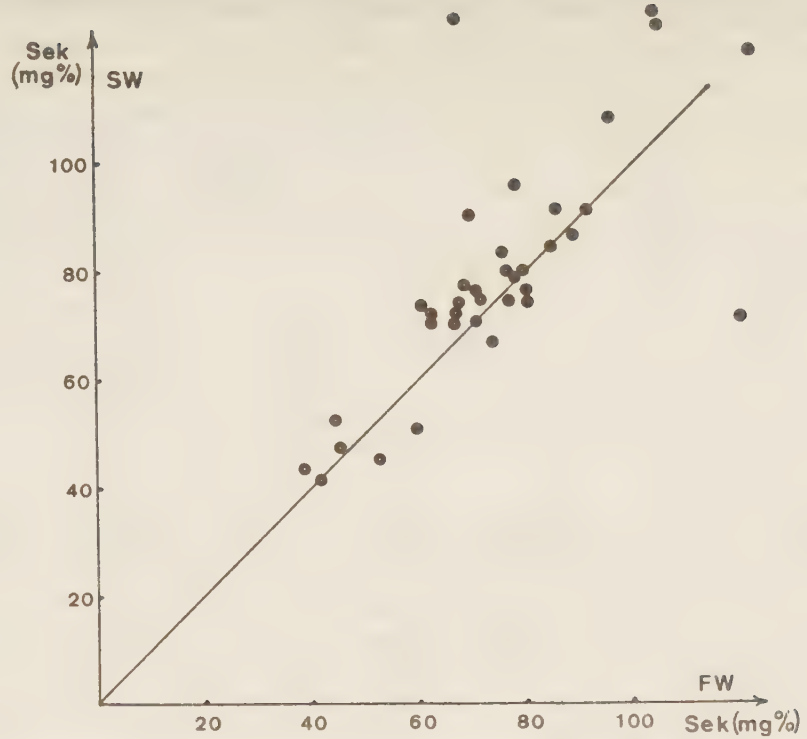

Abb.8 Streuung der Serumlipoproteinkonzentrationen (Sek) der LDL-Fraktion gemäß Tab.8, erhalten nach Präparation mit Festwinkel- (FW) und Ausschwing-(SW) Rotor bei der quantitativen Bestimmung des Apolipoprotein B mittels M-Partigen ß-Lipoprotein Immundiffusionsplatten

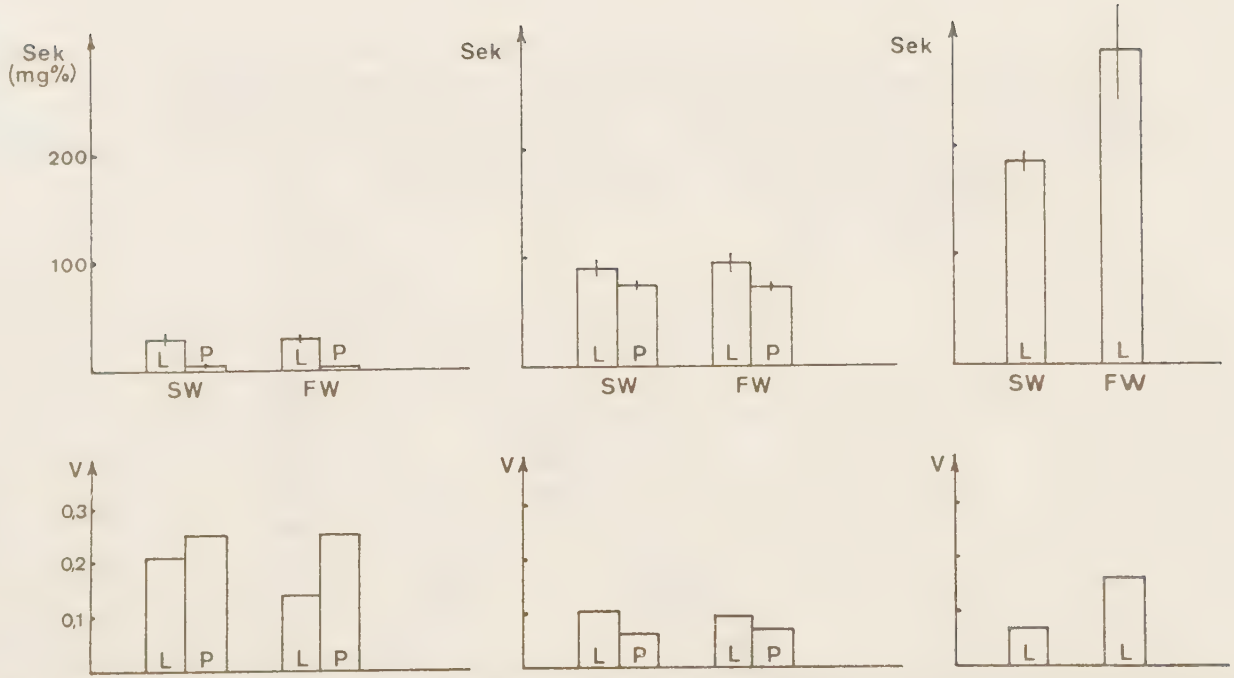

Abb.9 Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (V) der Serum-Lipoproteinkonzentrationen (Sek) gemäß Tab.10, die aufgrund der Blutnentnahmen drei Tage vor Ende und am letzten Tag einer Formeldiätperiode bestimmt wurden, gemittelt über die sechs Versuchspersonen und die drei Formeldiäten mit Normalkost. Zum Vergleich wurden die Werte einerseits nach Präparation mit Festwinkel- (FW) und Ausschwing- (SW) Rotor andererseits nach den Proteinbestimmungen mittels Methode LOWRY (L) und mittels M-Partigen ß-Lipoprotein-Immundiffusionsplatten dargestellt. Ein Korrekturfaktor bei der Methode LOWRY kam nicht zur Anwendung (s.Diskussion S. 21)

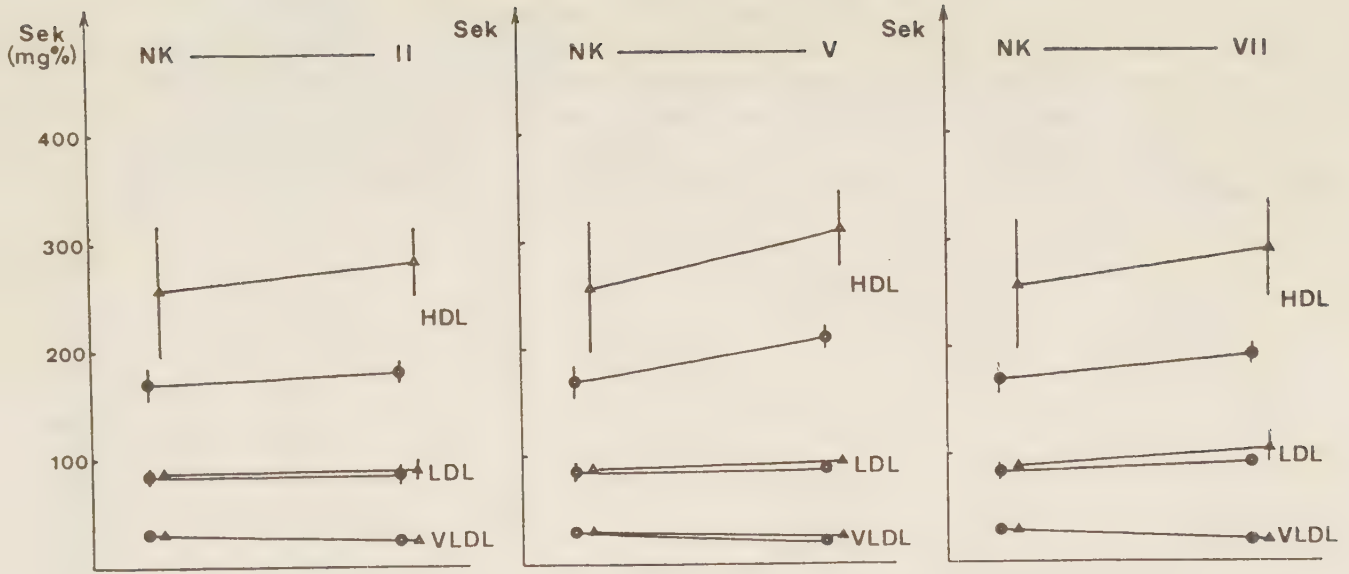

Abb.10 Änderung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Serumlipoproteinkonzentrationen (SeK) bei Normalkost (NK) unter Einfluß der Formeldiäten(II, V und VII) bei der Präparation mittels Festwinkel- (FW)- (▲) und Ausschwing- (SW)- (●) Rotor bei der Proteinbestimmung nach LOWRY

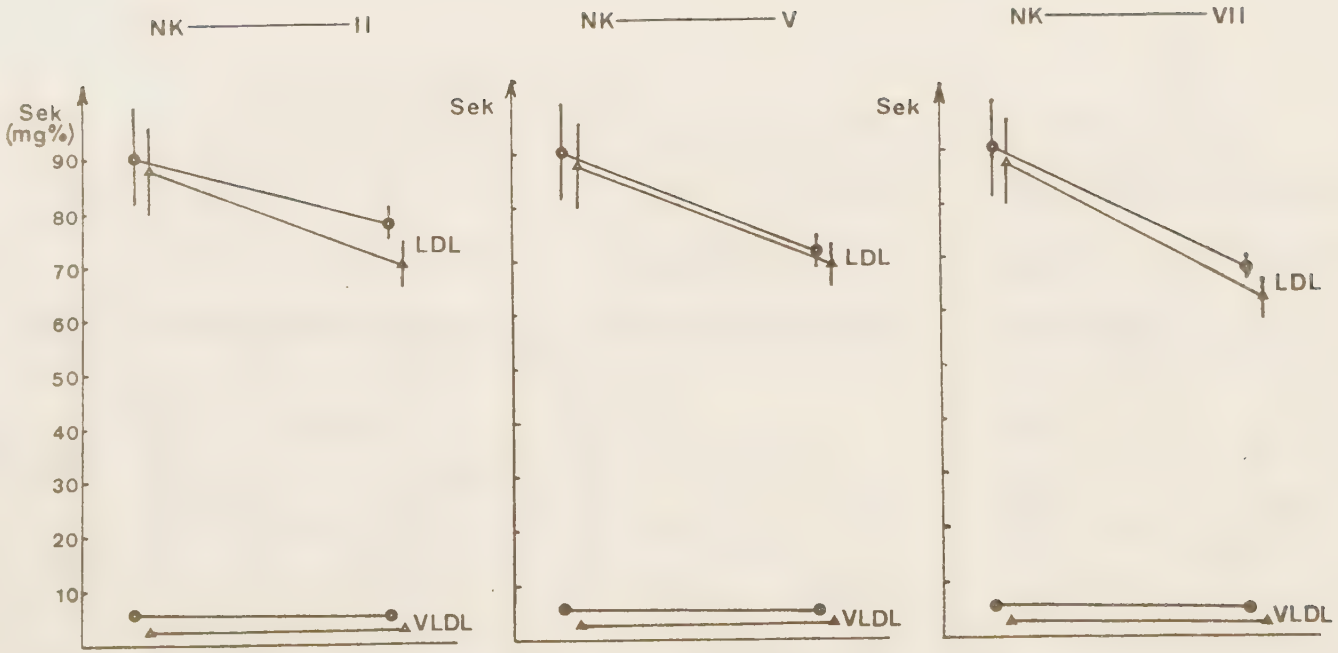

Abb.11 Änderung der Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen bei Normalkost (NK) unter Einfluß der Formeldiäten (II, V und VII) bei der Präparation mittels Festwinkel- (▲) und Ausschwing- (●) Rotor bei der Bestimmung des Apolipoprotein B mittels M-Partigen ß-Lipoprotein-Immundiffusionsplatten gemäß Tab.9

7.0 Literaturverzeichnis

AHRENS, E.H.:
Nutritional factors and Serum lipid levels.
Seminar in atherosclerosis.
Am. J. Med. 32, 928, 1975

ALAUPOVIC, P., SEIDEL, D., MC Conathy, W.J.,
FURMANN, R.H.:
Identification of the protein moiety of an abnormal human plasma low-density lipoprotein in abstructive jaundice.
FEBS-letters, 4, 113, 1969

ALBERS, J.J.; CABANA, V.G.; HAZZARD, W.R.:
Immunassay of Human Plasma Apolipoprotein B.
Metabolism, 24, 1339, 1975

ANDERSON, J. T., LAWLER, A., KEYES, N.:
Weight gain from simple overeating II. Serum lipids and blood volumes.
J. clin. Invest. 36, 81, 1957

ANDERSON, N. C.:
Zonal Ultrazentrifugation.
Fractions 1, by Beckman Instruments, Inc. Palo Alto, California 1965

BERG, K.:
A new serum typie system in man- the Lp-system.
Acta path. microbiol. Scand. 59, 369, 1963

BIERMAN, E.L.:
Abnormalities in carbohydrat and lipid metabolism in uremia:
Arch. int. Med. 126, 790, 197o.

BLANKENHORN, D. H., CHIN, H. P., LAU, F. Y. K.:
Ischemic heart disease in young adults. Metabolic and angiographic diagnosis in the prevalence of the type IV hyperlipoproteinemia.
Am. Int. Med. 69, 21, 1968

BRADBY, G. V. H., VALENTE, A.J., WALTON, K. W.:
Serum high density lipoproteins in peripheral vascular disease.
Lancet 1978, II, 1271

BUNGENBERG, DE JONG, J. J., MARSCH, J.B.:
Biosynthesis of plasma lipoproteins by rat liver ribosomes.
J. biol. Chem. 243, 192, 1968

BURNSTEIN, M., SCHOLNICK, H. R., MORFIN, R.:
Rapid methods for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions.
J. lipid Res. 11, 583, 197o

CASTELLI, W.P., DOYLE, J. T., GORDON, T., HAMES, C. G., HJORTLAND, M. C., HULLEY, S. B., KAGAN, A., ZUKEL, W. J.:
HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease.
Circulation, 55, 767, 1977

CASTELLI, W. P., DOYLE, J. T., GORDON, T., HAMES, C. G., HJORTLAND, M. D., HULLEY, S. B., KAGAN, A., ZUKEL, W. J.:
Alcohole and blood lipids.
Lancet 1977, II, 153

CHARMAN, R. C., LONDOWNE, R.:
Separation of human plasma lipoproteins by electrophoresis on cellulose acetate.
Anal Biochem. 19, 177, 1967

CHARMAN, R. C., BRAEULER, C.:
An evaluation of cellulose acetate electrophoresis for the determination of human plasma lipoprotein patterns.
Atherosclerosis 17, 483, 1973

CHIN, H. P., BLANKENHORN, D.:
Separation and quantitative analysis of serum lipoproteins by means of electrophoresis on cellulose acetate.
Clin. chim. Acta 20, 305, 1968

EDERER, F., LEREN, P., TURPEINEN, O., FRANTZ, J. D.:
Cancer among men on cholesterol lowering diets.
Lancet II, 203, 1971

EWING, A. M.:
The analysis of human serum lipoprotein distribution.
Advanc. lipid. res. 3, 25, 1965

FREDRICKSON, D. S., LEES, R. S.:
A system for phenotyping hyperlipoproteinemia.
Circulation 31, 321, 1965

FREDRICKSON, D. S., LEVY, R. J., LEES, R. S.:
Fat transport in lipoproteins - an integrated approach to mechanism and disorder.
New England J. Med. 276, 32, 94, 148, 215, 273, 1967

FREDRICKSON, D. S.:
The Family hyperlipoproteinemias, in
STANBURY, WYNGARDEN, FREDRICKSON
The metabolic basis of inherited disease.
(Mc Graw Hill, Nex York, 1978)

GRABAR, P., WILLIAMS, C. A.:
Methode immuno électrophoretique d'analyse de mélange du substances antigeniques.
Biochim. Biophys. Acta (Amst) 17, 67, 1955

GRIFFITH, O. M.:
Techniques of Preparative zonal and continous Flow Ultracentrifugation 2nd Edition,
Beckman Instruments, Inc. Art. 1976

GROEN, J., TJIONG, B. V., KAMMIWGA, C.E.,
WILLERBRANDS, A. F.:
Influence of nutrition, individuality and some other factors, including various forms of stress on serum cholesterol. An experiment on nine months duration in 60 normal human volunteers.
Voeding 13, 556, 1952

GUSTAFSON, A. P.:
Studies of the composition and structure of serum lipoproteins. Separation and characterization of phospholipidprotein residues obtained by partial delipidization of very low density lipoproteins of human serum.
Biochemistry 5, 632, 1966

HAVEL, R. J.:
Metabolism of Lipids in clytomicious and very low density lipoprotein. In:
Handbook of Physiology, Section 5, (Renold-Chill, Washington, 499, 1965)

HJERMANN, I., ENGER, S. C., HELGELAND, A. HOLME, I., LEREN, P., TRYGGI, K.:
The effect of dietary changes on high density lipoprotein cholesterol level.
J. A. M. A. 238, 2269, 1977

HOLLMANN, M., PAPENBERG, J., PIPER, W.:
Gelfiltration von Serumlipiden mit Agarose.
Klin. Wschr., 48, 493, 1970

HOJNACKI, J. L., NICOLOSI, R. J., HOOVER, G., LLANSH, N., ERSHOW, A. G., LOZY, M. E., HAYES, K. C.:
Comparison of two ultracentrifugation procedures for separation of Nonhuman primate Lipoproteins.
Analyt. Biochem. 88, (2), 485, 1978

HULLEY, S., ASHMANN, P., KULLER, L., LASSER, N., SHERWIN, R.:
HDL- cholesterol levels in the multiple risk factor intervention trial (MRFIT) by the MRFIT Research Group.
Lipids 14, 119, 1979

JENKINS, P. J., HARPER, R. W., NESTEL, P. J.;
Severity of coronary atherosclerosis related to lipoprotein concentration.
Br. Med. J. II, 388, 1978

KINSELL, L. W., PATRIDGE, J., BOLING, L., MORGAN, S., MICHAELS, G.:
Dietary modification of serum cholesterol and phospholipidlevels.
J. clin. Endocrinol. 12, 909, 1952

LEVY, L. R., FREDRICKSON, D. S.:
Heterogenity of plasma high density lipoproterins.
J. clin. Invest. 44, 426, 1965

LOWRY, V. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265, 1951

MAHLEY, R.W., HAMILTON, R. L., LIQUIRE, V. S.:
Characterization of lipoprotein particles isolated from the Golgi appartus of the rat liver.
J. lipid. Res., 10, 433, 1969

MIETTINEN, M., TURPEINEN, O., KARVONEN, M.J., ELOSNO, R., PAAVILAINEN, E.:
Effects of cholesterol- lowering diet an mortality from coronary heart disease and other causes.
Lancet II 835, 1972

MILLER, G. J., MILLER, N. E.:
Plasma - high- density- lipoprotein concentration and development of ischemic heart disease.
Lancet 1975, I, 10

MOORE, F. E.:
Serum Cholesterol Levels in Adults.
United States 1960- 1962.- National Center of Health Statistics, Series 11, No. 22. U. S. Department of Health, Education and Welfare, Washington 1967

NOBLE, R.P.:
Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose.
J. Lipid. Res., 9, 693, 1968

NORUM, K. R., GLOMSET, J. A., NICHOLS, A. V., FORTE, T.:
Plasma lipoproteins in familial lecithin- cholesterol acyl transferase deficiency: physical and chemical studies of low and high density lipoproteins.
J. clin. Invest. 50, 1131, 1971

OUCHTERLONY, O.:
Diffusion- in Gel- Methods for immunological Analysis.
Progr. Allergy 5, 1 - 78, 1958

QUARFORDT, S., LEVY, R. J., FREDRICKSON, D. S.:
On the lipoprotein abnormality in Typie III Hyperlipoproteinemia.
J. clin. Invest., 50, 75, 1971

RAPP, W.; KAHLKE, W.:
Lipoprotein- Elektrophorese in Agarosegel.
Clin. chim. Acta, 19, 493, 1968.

REDGRAVE, T. G.; ROBERTS, D. C. K.; WEST, C. E.:
Separation of Plasma Lipoproteins by Density- Gradient Ultracentrifugation.
Anal. Biochem., 65, 42, 1975

RIFKIND, B. M., TAMIR, J., HEISS, G., WALLACE, R. B., TYROLER, H. A.
Distribution of high density lipoproteins and other lipoproteins in selected LRC prevalence study populations: A brief survey.
Lipids 14, 105, 1979

SCHILLING, F. J., CHRISTAKIS, G., ORBACH, A., BECKER, W. B.:
Serum Cholesterol and Triglyceride. An epidemiological and pathogenetic Interpretation.
Amer. J. clin. Nutit. 22, 133- 138, 1969

SCHLIERF, G., WOLFRAM, G.:
Bedeutung des Fettes als krankmachender Faktor in der Ernährung.
Internist 18, 480, 1977

SEIDEL, D., SCHMITT, E. A., ALAUPOVIC, P.:
Ein abnormes low- density Lipoprotein II. Bedeutung in der Differentialdiagnose des Ikterus.
Dtsch. Med. Wschr., 95, 1805- 1809, 197o

SEIDEL, D., GRETEN, H.:
Hyperlipoproteinämie - Typ III. Eine Möglichkeit zur immunologischen Diagnostik.
Clin. Chim. Acta 30, 31 - 36, 197o

SEIDEL, D., AGOSTINI, B., MÜLLER, P.:
Structure of an abnormal plasma lipoprotein (LP-X) characterizing obstructive jaundice.
Biochem. Biophys. Acta 260, 142 - 152, 1972

SEIDEL, D., GRETEN, H., GEISEN, H.P., WENGELER, H., WIELAND, H.:
Further aspects of the characerization of high and very-low density lipoproteins in patients with liver disease.
Europ. J. clin. Invest., 2, 359, 1972

SEIDEL, D., GRETZ, H., RUPPERT, C.:
Significance of the LP-X-Test in differentioal diagnosis of jaundice.
Clin. Chem., 19, 86 - 91, 1973

STEIN, G., STEIN, Y., GOODMAN, D. S., FRIDGE, N.H.:
The metabolism of chylomicron ester in rat liver.
J. cell. Biol. 43, 410, 1969

STREJA, D., STEINER, G., KWITEROVICH, P. O.:
Plasma high density lipoproteins and ischemic heart disease.
Ann. Intern. Med. 89, 871, 1978

SVEDBERG, T., PETERSON, K. O.:
Die Ultrazentrifuge
Steinkopff, Dresden-Leipzig, 1940

UTERMANN, G., MENTEL, H. J., LANGER, K. H., DIEKER, P.:
Lipoproteins in lecithine-cholesterol-acyltransferase-(LACT) deficiency.
Biochemistry 11, 3251, 1971

UTERMANN, G., WIEGENDT, H.:
Comparative studies of the Lp-(a)-Lipoprotein and low-density lipoproteins of human serum.
Hopple-Seyer's Z. Physiolog. Chemie 352, 938 - 946, 1971

VOGELBERG, K. H., UTERMANN, G., GRIES, F. A.:
"Sinking" prae-ß-Lipoproteine des menschlichen Serums.
In: Die Lipoproteine des Blutes. (Hrsg. H. Ditschuneit)
Steinkopff, Darmstadt, 195, 1973

VOGELBERG, K. H., UTERMANN, G., GRIES, F. A.:
Zur Differenzierung des Lp-(a)-Lipoproteins mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese.
Z. klin. Biochem., 11, 291 - 296, 1973

WALTON, K.:
The immunological properties of serum lipoproteins.
In: Die Lipoproteine des Blutes.
Wiss. Veröff. Dtsch. Ges. Ernährung 23, (Hrsg. H. Ditschuneit) -
Steinkopff, Darmstadt 47 - 55, 1973

WIELAND, H., SEIDEL, D.:
Plasmalipoproteine bei Patienten mit Hyperthyreose.
Isolierung und Charakterisierung eines abnormalen high-density-Lipoproteins.
Z. klin. Chem. Biochem. 10, 311 - 321, 1972

WINDMUELLER, H. G., LEVY, R. J.:
Total inhibition of hepatic ß-Lipoprotein in the rat by orotic acid.
J. biol. Chem. 242, 2246, 1967

WINDMUELLER, H. G., LEVY, R. J.:
Production of ß-Lipoproteins by intestine in the rat.
J. biol. Chem. 243, 4878, 1968

WOLFRAM, G., SCHLIERF, G.:
LDL - Cholesterin und HDL- Cholesterin-
Risikofaktor oder Schutzfaktor?
Internist 20, 613 - 618, 1979

WOOD, P. D., HASKELL, W., L.:
The effect of exercise on plasma high density lipoproteins.
Lipids 14, 417, 1979

Für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung möchte ich Herrn Professor Dr. N. Zöllner und Herrn Professor Dr. G. Wolfram, sowie Herrn Dr. U. Sprandel, Herrn Dr. O. Adam und Frau I. Fischer danken.

L e b e n s l a u f

20. 5. 49	in Hindelang/Bayern geboren
1955 - 68	Schulbesuch in Sonthofen, Kempten und Oberstdorf
1968	Abitur am Allgäu-Gymnasium Oberstdorf
1968 - 71	Studium für das Lehramt an Volksschulen an der Pädagogischen Hochschule in Eichstätt und München
1971	1. Lehramtsprüfung an der Pädagogischen Hochschule München
1971 - 72	Tätigkeit als Lehramtsanwärter im Reg.Bez. Schwaben nebenbei Studium der Pädagogik, Psychologie und Soziologie an der Ludwig- Maximilians- Universität München
1972 - 78	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität München
1976	Durchführung des experimentellen Teils dieser Dissertation
1978	Approbation nach bestandener Ärztlicher Prüfung
1979 - 80	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Chirurgischen Abteilung des Krankenhauses Indersdorf/Dachau
seit 1980	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Inneren Abteilung des Stadtkrankenhauses Sonthofen

Sofortdruck-Center Werner Boller · Rathausplatz 11 · 8960 Kempten (Allgäu)